

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 août 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/058725 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 39/155, 39/155

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00270

(81) États désignés (*national*) : AU, BR, CA, CN, JP, MX, US,
ZA.

(22) Date de dépôt international :
23 janvier 2002 (23.01.2002)

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, TR).

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/00875 23 janvier 2001 (23.01.2001) FR

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :
— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement*

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : PIERRE
FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance,
F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

Publiée :
— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : POWER,
Ultan [IE/FR]; 115, route de la Bossenaz, F-74160 Ar-
champs (FR). N'GUYEN, Thien, Ngoc [FR/FR]; 7, rue les
Petits Hutins, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

WO 02/058725 A2

(54) Title: NON-GLYCOSYLATED PEPTIDES DERIVED FROM THE RSV G PROTEIN AND USE THEREOF IN A VACCINE

(54) Titre : PEPTIDES NON GLYCOSYLES DERIVES DE LA PROTEINE G DU VRS ET LEUR UTILISATION DANS UN
VACCIN

(57) Abstract: The invention concerns the respiratory syncytial virus, and more particularly the identification of novel non-glyco-
sylated antigens, useful in particular for therapeutic and prophylactic treatment of diseases caused by said virus.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte au virus respiratoire syncytial, et plus particulièrement à l'identification de nouveaux
antigènes non glycosylés, utiles notamment pour le traitement thérapeutique et prophylactique des affections provoquées par ce virus.

BEST AVAILABLE COPY

PEPTIDES NON GLYCOSYLES DERIVES DE LA PROTEINE G DU VRS ET LEUR UTILISATION DANS UN VACCIN

La présente invention se rapporte au virus respiratoire syncytial, et plus
5 particulièrement à l'identification de nouveaux antigènes, utiles notamment pour le
traitement thérapeutique et prophylactique des affections provoquées par ce virus.

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est classé dans la famille des
Paramyxoviridae, genre pneumovirus comportant un génome ARN non segmenté, de
polarité négative, codant pour 11 protéines spécifiques. Parmi les VRS, on peut citer
10 notamment le VRS humain de type A et de type B et le VRS bovin dont les séquences
génomiques sont connues.

Le VRS est l'un des agents étiologiques les plus fréquemment rencontrés chez le
nourrisson et chez les personnes âgées. Les bronchiolites sont souvent graves chez
l'enfant et nécessitent l'hospitalisation. Actuellement il n'existe pas de moyens de
15 prévention contre la maladie due au VRS. La première infection au VRS ne prévient pas
contre la suivante. Le traitement des cas graves par antibiothérapie (Ribavirine) et/ou
associé avec l'immunothérapie (immunoglobulines humains) ne peuvent pas atténuer
l'aggravation de la maladie. De plus, ce type de traitement reste encore très coûteux.
Les essais cliniques avec les anticorps monoclonaux HNK20 de ORAVAX (dirigés
20 contre la protéine F du VRS) n'ont pas montré d'efficacité du traitement par rapport au
placebo contre l'infection du VRS chez l'enfant. Dans les années 60, les tentatives
d'immunisation des enfants avec un vaccin VRS inactivé à la formaline (FI-RSV)
avaient eu pour conséquence l'aggravation de la maladie au lieu de conférer une
protection contre l'infection naturelle au VRS. Cette aggravation de la maladie a été
25 caractérisée par une augmentation des neutrophiles polymorphonucléaires, des
lymphocytes et des éosinophiles dans le sang et les poumons (Kim et al., Pediatric Res.
10:75-78 (1976)). Il a aussi été démontré chez la souris que FI-RSV induisait une
réponse immune de type Th2 (T-helper 2), se traduisant notamment par une production
importante d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IL-13, des cytokines Th2. Des études récentes ont
30 permis de corréliser cette immunopathologie observée suite à l'administration de FI-RSV
avec une région précisément déterminée, un épitope CD4+ de séquence 185-193 de la
protéine G du VRS humain de type A (de séquence SEQ ID No. 4 : ICKRIPNKK), qui

s'avère primordiale pour obtenir une réponse en cytokines Th2 chez les souris (Varga et al., J. Immunol., 165:6487-6495, 2000).

Parmi les documents relatifs à l'utilisation d'une protéine structurale particulière, ou d'un de ses fragments, du VRS en tant qu'immunogène et/ou pour la
5 préparation de vaccin, on peut citer :

- la demande internationale de brevet WO 87/04185, publiée le 16 juillet 1987, qui propose d'utiliser des protéines structurales du VRS en vue d'un vaccin, comme les protéines d'enveloppe appelées protéine F (protéine de fusion) ou protéine G (protéine d'attachement), une glycoprotéine de 22 Kd, une protéine de 9,5 Kd, ou la protéine
10 majeure de capsid (protéine N) ;

- la demande internationale de brevet WO 89/02935, publiée le 6 avril 1989, qui décrit les propriétés de protection de la protéine F entière du VRS, éventuellement modifiée sous forme monomérique ou déglycosylée. Une série de fragments de la protéine F a été clonée en vue de rechercher leurs propriétés neutralisantes ;

- 15 - la demande internationale de brevet WO 95/27787, publiée le 19 octobre 1995, montrant que la protéine G du VRS ou certains de ses fragments, peuvent être utiles dans la préparation de produits destinés au traitement et/ou à la prévention d'affections provoquées par le VRS, sous-groupe A ou B ; et

- la demande de brevet européen EP 0 814 089, publiée le 29 décembre 1997, proposant d'utiliser certains fragments de la protéine F de fusion ou la protéine G
20 entière de type recombinant du VRS pour la protection contre les infections par le VRS de produits destinés au traitement et/ou à la prévention d'affections provoquées par le VRS.

Des peptides structurellement homologues à la séquence 149-197 de la protéine
25 G et dans laquelle aucun oligosaccharide n'est lié à une sérine, thréonine ou asparagine sont également décrits dans la demande internationale de brevet WO 97/46581 publiée le 11 décembre 1997 ; il y est précisé que cette absence de glycosylation permet de rendre cette région accessible pour se lier à des récepteurs.

On peut enfin citer la demande internationale de brevet WO 99/03987, publiée le
30 28 janvier 1999, et le document publié par Simard et al. (Antiviral Research, 28:303-315, 1995) qui décrivent des fragments de la protéine G du VRS contenant des épitopes spécifiques, utilisés dans un vaccin contre l'infection au VRS.

Toutefois, aucune de ces demandes ne répondait au problème d'obtenir une réponse immune suffisante et présentant le moins de risque possible d'immunopathologies associées à la production d'IL-5 ou à d'autres cytokines /
5 chimokines impliquées dans cette réaction immunopathogène comme, mais non limité à, l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

De manière surprenante, il a été mis en évidence qu'un peptide immunogène non glycosylé dérivé de la protéine G du VRS répond aux problèmes mentionnés ci-dessus.

Ainsi, la présente invention a pour objet un peptide immunogène dérivé de la
10 protéine G du VRS non glycosylé et comportant au moins la séquence peptidique 148-193 de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du VRS bovin, ou une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences peptidiques 148-193 de ces protéines G, de préférence à l'exception des peptides dérivés de la protéine G du VRS ayant pour séquence une séquence choisie parmi les séquences :

- 15 a) SEQ ID Nos. 1 à 3 ;
- b) SEQ ID Nos. 1 à 3 comprenant chacune d'entre elles les mutations C173S et C186S ;
- c) les séquences 140-200, 140-198, 140-198, 140-196 et 140-194 des séquences telles que décrites en a) ou b) ;
- d) SEQ ID No. 1 comprenant les 6 mutations F163S, F165S, F168S, F170S, C173S et
20 C186S ;
- e) SEQ ID No. 1 comprenant les 4 mutations N191S, K192N, G195K et T198P ;
- f) SEQ ID No. 1 comprenant les 4 mutations N157K, N160K, N161D et F163Y ;
- g) SEQ ID No. 1 comprenant les 8 mutations N157K, N160K, N161D, F163Y, N191S, K192N, G195K et T198P ; ou
- 25 h) les séquences 124-203 et 1-230 de la protéine G du VRS (Simard et al., 1995).

Parmi lesdits peptides immunogènes selon l'invention, on préfère ceux dérivés de la protéine G du VRS non glycosylé comportant au moins la séquence peptidique 148-193 de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du VRS bovin, ou une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences
30 peptidiques 148-193 de ces protéines G, et dont le fragment 185-193 desdites protéines G est identique à 100 % au fragment 185-193 desdites protéines G.

Parmi lesdits peptides immunogènes selon l'invention, on préfère ceux dérivés du VRS humain du sous-groupe A ou B, notamment dérivés du type A et comprenant la séquence SEQ ID No. 4 de la liste des séquences ci-après.

Par le terme «peptide immunogène», on entend désigner tout peptide qui, lorsqu'il est de préférence associé à un porteur ou un adjuvant, est capable de générer ou accroître une réponse immunitaire dirigée contre le VRS.

Dans la présente invention, on entendra désigner par le terme «peptide» également les polypeptides.

Dans la présente description, la notation «148-193» pour la séquence peptidique 148-193 doit être entendue comme signifiant que ladite séquence d'acides aminés est la séquence comprise entre les acides aminés en position 148 et 193, extrémités incluses, de la protéine G, la protéine G étant une protéine d'enveloppe du VRS.

Les séquences peptidiques ainsi définies par ce type de notation dans la présente description peuvent être aisément identifiables à partir des séquences SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 et SEQ ID No. 3 de la liste des séquences ci-après représentant respectivement le fragment peptidique de séquence 130-230 de la protéine G du VRS de type A, de type B et de type bovin.

Pour ces trois séquences SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 et SEQ ID No. 3 représentées dans la liste des séquences ci-après, l'acide aminé situé en première position correspond ainsi et respectivement à l'acide aminé situé en position 130 de la séquence de la protéine G du VRS de type A, de type B et de type bovin.

Les peptides selon l'invention, en particulier le peptide de séquence 148-193, peuvent notamment être obtenus par synthèse chimique peptidique classique, sans étapes de glycosylation, connue de l'homme du métier ou par voie recombinante sans glycosylation.

Les méthodes de préparation des peptides recombinants non glycosylés sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, on peut notamment citer les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., Curr. Op. Biotechnology 4:520-525, 1993), et plus particulièrement E. coli.

Par séquence d'acides aminés présentant une homologie d'au moins 80 % après alignement optimal avec une séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés déterminée, on entend désigner une séquence qui après alignement optimal avec ladite séquence déterminée comprend un pourcentage d'identité d'au moins 80 % avec ladite
5 séquence déterminée.

Par «pourcentage d'identité» entre deux séquences d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant
10 réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par «fenêtre de comparaison» pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison
15 peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes
20 (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale par fenêtre de
25 comparaison dans laquelle la région de la séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce
30 nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, «BLAST 2 sequences», disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres «open gap penalty» : 5, et «extension gap penalty» : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice

- 5 «BLOSUM 62» proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

Parmi lesdites séquences présentant une homologie d'au moins 80 %, on préfère les séquences de peptides capables d'induire une réponse immunitaire dirigée contre le VRS, telle que l'induction d'une réponse immunitaire mesurée au moyen des techniques
10 standards décrites dans les exemples ci-après, et présentant le moins de risque possible d'immunopathologies associées, ce risque pouvant être évalué en particulier par les méthodes décrites à l'exemple V ci-après.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, ledit peptide immunogène dérivé de la protéine G du VRS non glycosylé selon l'invention est un fragment de la
15 séquence peptidique 130-230 de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du VRS bovin, ou un fragment d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences peptidiques 130-230 de ces protéines G.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, ladite séquence peptidique 148-193 de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du
20 VRS bovin comprend en position 173, 176, 182 et 186 une cystéine.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, le peptide selon l'invention présente au moins un premier pont disulfure reliant les résidus 173 et 186 et un deuxième pont disulfure reliant les résidus 176 et 182.

Parmi lesdits peptides immunogènes dérivés de la protéine G du VRS selon
25 l'invention, on préfère les peptides ayant pour séquence une séquence choisie parmi la séquence 148-193, 148-200, 148-230, 140-193, 140-230, 130-193 et 130-200 de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du VRS bovin.

Lesdits peptides immunogènes dérivés de la protéine G du VRS selon l'invention pourront également être choisis parmi les peptides de séquence :

- 30 a) SEQ ID Nos. 1 à 3 ;
b) SEQ ID Nos. 1 à 3 comprenant chacune d'entre elles les mutations C173S et C186S ;

- c) les séquences 140-200, 140-198, 140-198, 140-196 et 140-194 des séquences telles que décrites en a) ou b) ; et
- d) SEQ ID No. 1 comprenant les 6 mutations F163S, F165S, F168S, F170S, C173S et C186S ;
- 5 (fragments peptidiques de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du VRS bovin de séquence 140-194, 140-196, 140-200, 140-198 et 130-230 dont certaines de ces séquences peuvent présenter un acide aminé substitué par rapport à la séquence de la protéine G sauvage), parmi les peptides de séquence :
- e) SEQ ID No. 1 comprenant les 4 mutations N191S, K192N, G195K et T198P ;
- 10 f) SEQ ID No. 1 comprenant les 4 mutations N157K, N160K, N161D et F163Y ; et
- g) SEQ ID No. 1 comprenant les 8 mutations N157K, N160K, N161D, F163Y, N191S, K192N, G195K et T198P ;
- (fragments peptidiques de la protéine G du VRS humain de sous-groupe A de séquence 130-230 comportant respectivement 4, 4 et 8 acides aminés substitués par rapport à la
- 15 séquence sauvage) ou parmi les peptides de séquence 124-203 et 1-230 desdites protéines G sauvages du VRS humain ou bovin.

L'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend dans un milieu pharmaceutiquement acceptable au moins un peptide selon l'invention.

- 20 Ces compositions selon l'invention peuvent en outre contenir au moins une protéine porteuse et/ou un adjuvant.

La protéine porteuse peut être avantageusement choisie parmi la protéine TT (tétanus toxoïde), la protéine DT (toxôide diphtérique), la protéine de liaison à la sérumalbumine humaine du Streptocoque et ses fragments, la sous-unité B de la toxine

25 cholérique (CTB) et les extraits de protéines membranaires bactériennes telles que les OMPC de *Neisseria meningitidis* (Vella et al., Infect. Immun., 60:4977-4983, 1992), TraT d'*Escherichia coli* (Croft et al., J. Immunol., 146:793-798, 1991) ou PorB de *Neisseria meningitidis* (Fusco et al., J. Infect. Dis., 175:364-372, 1997).

- Une des protéines porteuses préférées consiste en une OmpA d'une bactérie du
- 30 genre *Klebsiella*, protéine majeure de la membrane externe baptisée P40, présentant une activité de protéine porteuse, par voie systémique, pour des antigènes sous-unitaires

peptidiques (WO 95/27787 et WO 96/14415 ; Haeuw et al., Eur. J. Biochem., 255:446-454, 1998 ; Plotnicky-Gilquin et al., J. Virol., 73:5637-5645, 1999).

Dans les compositions selon l'invention contenant au moins une protéine porteuse, ladite protéine porteuse sera de préférence non glycosylée.

5 L'adjuvant peut notamment être choisi parmi le MPL-A, le Quil-A, l'ISCOM, le Diméthyl Dioctadécyl Ammonium sous forme de bromure (DDAB) ou de chlorure (DDAC), l'alum (hydroxyde d'aluminium), l'adjuphos, les CpG, la Leif, la CT, (toxôïde du choléra), la LT (Heat labile enterotoxine) et les versions détoxifiées de la CT ou la LT.

10 Le peptide selon l'invention peut être associé, par mélange ou par couplage, à la protéine porteuse et/ou à l'adjuvant.

Le couplage est de préférence un couplage covalent, qui peut être réalisé par la voie chimique ou par des techniques d'ADN recombinant.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, il est introduit un ou
15 plusieurs éléments de liaison dans le peptide selon l'invention et/ou dans ledit porteur ou adjuvant pour faciliter le couplage chimique, de préférence, ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison, notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre le peptide
20 selon l'invention et le porteur ou adjuvant. Le couplage covalent entre le peptide selon l'invention et ledit porteur ou adjuvant peut être réalisé à l'extrémité N- ou C- terminale dudit peptide. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité dudit peptide choisi pour effectuer le couplage et de la nature dudit porteur ou adjuvant à coupler.

25 Dans un autre mode de réalisation particulier, le couplage entre le peptide selon l'invention et ledit porteur ou adjuvant est réalisé par recombinaison génétique, lorsque ledit porteur ou adjuvant est de nature peptidique.

Les conjugués issus d'un couplage entre le peptide selon l'invention et ledit porteur ou adjuvant peuvent être préparés par recombinaison génétique. La protéine
30 chimérique ou hybride (le conjugué) peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ledit peptide

selon l'invention, d'une séquence codant pour ledit porteur ou adjuvant de nature protéique.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour
5 les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (Gene expression technology, Methods in Enzymology, vol. 185:3-187, 1990).

Selon l'un des aspects de l'invention, le peptide selon l'invention est conjugué à
10 la protéine porteuse ou à l'adjuvant par une protéine de liaison ; cette protéine de liaison peut notamment être choisie parmi un récepteur de l'albumine sérique de mammifère et les récepteurs présents à la surface des cellules mucosales.

L'invention a également pour objet la composition selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre au moins
15 un deuxième antigène, immunogène ou haptène du VRS et/ou un antigène, immunogène ou haptène dérivé de micro-organisme responsable de pathologies des voies aériennes choisi parmi les parainfluenza virus (PIV 1, 2, 3 et 4), l'influenza virus (A et B), les hantavirus, les streptocoques, les pneumocoques, haemophilus influenza type b, les rhinovirus, les coronavirus et les méningocoques.

20 Par « immunogène, antigène ou haptène », on entend désigner en particulier tout composé exprimé par un agent infectieux, ou un de leurs analogues structuraux, qui seul ou en association avec un adjuvant ou porteur est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique dudit agent infectieux.

On entend également désigner par "immunogène, antigène ou haptène" dans la
25 présente description un composé présentant une analogie structurale avec ledit antigène ou haptène capable d'induire une réponse immunologique dirigée contre ledit antigène ou haptène dans un organisme préalablement immunisé avec ledit composé analogue.

Dans un mode de réalisation encore plus préféré de l'invention, ledit deuxième
30 antigène du VRS comprend au moins un fragment de la protéine G du virus respiratoire syncytial, ledit fragment comprenant un épitope T ou étant uniquement composé dudit épitope T.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, ledit deuxième antigène du VRS comprend au moins un fragment de la protéine F du virus respiratoire syncytial, ledit fragment comprenant un épitope T ou étant uniquement composé dudit épitope T.

Dans les compositions selon l'invention contenant au moins un deuxième
5 antigène ou immunogène dérivé du VRS et/ou un antigène dérivé de micro-organisme responsable de pathologies des voies aériennes, ledit antigène sera de préférence non glycosylé.

Au sens de la présente invention, le milieu pharmaceutiquement acceptable est le milieu dans lequel les composés de l'invention sont administrés, préférentiellement un
10 milieu injectable chez l'homme. Il peut être constitué d'eau, d'une solution aqueuse saline ou d'une solution aqueuse à base de dextrose et/ou de glycérol.

L'invention comprend également une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité ; ainsi, elle peut être véhiculée sous
15 forme de liposomes, virosomes, nanosphères, microsphères ou microcapsules.

L'invention a également pour objet des anticorps, monoclonaux ou polyclonaux, dirigés contre les peptides selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux sont, de préférence, humanisés et produits par la voie recombinante. Selon un autre aspect de l'invention, ils sont obtenus par la méthode
20 de librairie de phages.

De préférence, l'anticorps monoclonal, polyclonal ou l'un de leurs fragments, est caractérisé en ce qu'il est capable de se fixer spécifiquement sur un épitope ou déterminant des peptides non glycosylés selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être préparés à partir
25 d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 1975 (Nature, 256:495-497, 1975).

Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple par immunisation d'un animal, en particulier une souris ou un lapin, avec le peptide selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse immunitaire, puis purification des anticorps
30 spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixée, ledit peptide ayant servi d'antigène.

Les anticorps de l'invention comprennent également tout fragment dudit anticorps monoclonal capable de se fixer sur un épitope du peptide selon l'invention sur lequel se fixe l'anticorps monoclonal ou polyclonal dont ledit fragment est issu. Des exemples de tels fragments incluent en particulier des anticorps monoclonaux simple
5 chaîne ou des fragments monovalents Fab ou Fab' et des fragments divalents tels que F(ab')₂, qui possèdent la même spécificité de fixation que l'anticorps monoclonal ou polyclonal dont ils sont issus. Un fragment selon l'invention pourra également être un fragment Fv simple chaîne produit par des méthodes connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par Skerra et al. (Science, 240:1038-1041, 1988) et King
10 et al. (Biochemical J., 290:723-729, 1991).

Selon la présente invention, des fragments d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps monoclonaux ou polyclonaux tels que décrits précédemment par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par
15 réduction chimique. D'une autre manière, les fragments d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux compris dans la présente invention peuvent être synthétisés par des synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied Biosystems, etc., ou peuvent être préparés manuellement en utilisant des techniques connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par Geysen et al. (J.
20 Immunol. Methods, 102:259-274, 1978).

En général, pour la préparation d'anticorps monoclonaux, polyclonaux ou leurs fragments, on pourra se référer aux techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel « Antibodies » (Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications pp. 726, 1988) ou à la technique de préparation à partir
25 d'hybridomes décrite par Kohler et Milstein en 1975.

Les anticorps monoclonaux humanisés selon l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art (Carter et al., PNAS, 89: 4285-4289, 1992 ; Mountain, et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992).

30 De tels anticorps monoclonaux humanisés selon l'invention sont préférés pour leur utilisation dans des méthodes thérapeutiques.

Les anticorps de l'invention, ou leurs fragments pourront également être marqués par un marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

Les anticorps monoclonaux marqués selon l'invention ou leurs fragments incluent par exemple des anticorps dits immunoconjugués qui peuvent être conjugués
5 par exemple avec des enzymes telles que la peroxydase, la phosphatase alcaline, la β -D-galactosidase, la glucose oxydase, la glucose amylase, l'anhydrase carbonique, l'acétylcholinestérase, le lysozyme, la malate déhydrogénase ou la glucose-6 phosphate déhydrogénase ou par une molécule comme la biotine, la digoxigénine ou la 5-bromo-désoxyuridine. Des marqueurs fluorescents peuvent être également conjugués aux
10 anticorps monoclonaux ou leurs fragments de l'invention et incluent notamment la fluorescéine et ses dérivés, la rhodamine et ses dérivés, la GFP (GFP pour « Green Fluorescent Protein »), le dansyl, l'umbelliférone etc.. Dans de tels conjugués, les anticorps monoclonaux de l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des méthodes connues de l'homme de l'art. Ils peuvent être couplés aux enzymes ou aux
15 marqueurs fluorescents directement ou par l'intermédiaire d'un groupe espaceur ou d'un groupe de liaisons tel qu'un polyaldéhyde, comme le glutaraldéhyde, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DPTA), ou en présence d'agents de couplage tels que le périodate etc.. Les conjugués comportant des marqueurs de type fluorescéine peuvent être préparés par réaction avec
20 un isothiocyanate.

D'autres conjugués peuvent inclure également des marqueurs chimioluminescents tels que le luminol et les dioxétanes ou des marqueurs bioluminescents tels que la luciférase et la luciférine.

Parmi les marqueurs pouvant être fixés sur l'anticorps monoclonal ou un de ses
25 fragments selon l'invention, on préfère également les marqueurs radioactifs tels que ^{14}C , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{152}Eu , ^{59}Fe , ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{75}SE et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui peuvent être détectés par des moyens connus tels que par exemple le compteur gamma ou à scintillations ou par autoradiographie.

Les peptides et/ou les anticorps selon l'invention peuvent, selon un mode de
30 mise en œuvre de l'invention, entrer dans la composition d'un kit de diagnostic.

Les peptides et les anticorps selon l'invention peuvent être utilisés à titre de médicament, et plus particulièrement pour la préparation d'une composition destinée au

traitement préventif ou curatif des affections provoquées par le VRS humain, sous-groupe A ou B, ou par le VRS bovin, de préférence par le VRS humain, notamment de sous-groupe A.

Ainsi, l'invention concerne encore l'utilisation d'un peptide immunogène dérivé
5 de la protéine G du VRS non glycosylé et comportant au moins la séquence peptidique 185-193 de la protéine G du VRS humain, sous-groupe A ou B, ou bovin, de préférence du VRS humain du sous-groupe A ou B, notamment du sous-groupe A de séquence SEQ ID No. 4, ou comportant une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences peptidiques 185-193 de ces protéines G, ou d'un anticorps selon
10 l'invention :

- pour la préparation d'une composition pharmaceutique, préférentiellement d'un vaccin, destiné au traitement prophylactique ou thérapeutique des affections provoquées par le VRS humain, sous-groupe A ou B, ou bovin et n'induisant pas d'immunopathologies ; ou encore
- 15 - pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse immunitaire contre le VRS et n'induisant pas d'immunopathologies.

Pour ces deux utilisations ci-avant selon l'invention, parmi lesdits peptides immunogènes, on préfère les peptides immunogènes selon la présente invention, en
20 particulier :

- a) ceux dérivés de la protéine G du VRS non glycosylé comportant au moins la séquence peptidique 148-193 de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du VRS bovin, ou une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences peptidiques 148-193 de ces protéines G, et dont le fragment 185-
25 193 est identique à 100 % au fragment 185-193 desdites protéines G ; ou
- b) ceux tels que ci-avant définis en a) et dont la séquence est comprise dans la séquence 130-230 de ces protéines G, notamment les peptides immunogènes non glycosylés de séquence SEQ ID No. 1, No. 2 et No. 3 notés respectivement G2A (ou G2Na), G2B et G2V, le peptide G2A étant particulièrement préféré.

30

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1 : Migration sur gel SDS Page de la protéine BBG2Na exprimée dans *E. coli* et dans des cellules HEp-2 avant et après traitement avec des enzymes de déglycosylation.

Figure 2 : Antigénicité de BBG2Na non-glycosylé et glycosylé vis-à-vis d'un panel
5 d'anticorps monoclonaux spécifiques pour le fragment de la protéine G du VRS et pour la partie BB de BBG2Na.

GlyBBG2Na = BBG2Na glycosylé ; BBG2Na = BBG2Na non-glycosylé. Les anticorps monoclonaux 5B7, 5C2, 8A3, 11F7 et 18D1 sont spécifiques pour le fragment de la protéine G du VRS dans BBG2Na. L'anticorps monoclonal 13F10 est spécifique
10 pour la partie BB de BBG2Na.

Figure 3 : Immunogénicité de BBG2Na glycosylé et non-glycosylé chez la souris.

BBG2Na = BBG2Na non-glycosylé ; gBBG2Na = BBG2Na glycosylé ; Cell Ag = antigène contrôle cellulaire ; FI-RSV = VRS inactivé par le formol ; PBS = phosphate buffered saline.

Figure 4 : Efficacité protectrice de BBG2Na glycosylé et non-glycosylé chez la souris BALB/c.
15

BBG2Na = BBG2Na non-glycosylé ; gBBG2Na = BBG2Na glycosylé ; Cell Ag = antigène contrôle cellulaire ; FI-RSV = VRS inactivé par le formol ; PBS = phosphate buffered saline.

Figure 5 : Nombre de cellules nucléées infiltrant les poumons après challenge et populations cellulaires présentes dans ces poumons représentées par le rapport CD4/CD8.
20

Figure 6 : Nombre de granulocytes (LGL) et de cellules marquées par l'anticorps RB6-8B5 (polynucléaires).

Figure 7 : La sécrétion des cytokines Th2 (IL-5 et IL-10) ; augmentation significative de la sécrétion des cytokines chez les souris immunisées avec gBBG2Na et FI-VRS par rapport à celles traitées avec BBG2Na.
25

On peut également noter que le pourcentage de lymphocytes de poumon sécrétant des cytokines de type Th2 chez les souris immunisées avec gBBG2Na et FI-VRS est similaire.
30

EXEMPLES

Exemple I

Le peptide de fusion BBG2Na est composé d'un fragment très conservé de la protéine G du VRS-A, fragment dénommé G2Na (fragment 130-230 de la protéine G du VRS humain de type A), fusionné par génie génétique au site de liaison à l'albumine de la protéine G du streptocoque, site appelé BB. Ce peptide ainsi qu'une méthode de production dudit peptide sont décrits dans l'art antérieur et notamment dans la demande de brevet internationale de brevet WO 95/27787.

Afin de mettre en évidence l'importance de la non-glycosylation de ce peptide, nous avons produit une protéine recombinante, désignée BBG2Na, dans *E.coli* et dans des cellules eucaryotes HEp-2. Les protéines ont été purifiées sur des colonnes de HSA-sepharose. La confirmation de la glycosylation et la non-glycosylation des protéines exprimées dans les systèmes eucaryotiques et procaryotiques, a été démontrée par le traitement des protéines avec des enzymes de déglycosylation et l'analyse des produits sur gel SDS-PAGE de 9 %.

Comme mise en évidence dans la figure 1, la protéine issue de l'expression procaryotique migre à la même hauteur, peu importe le traitement ou non avec les enzymes de déglycosylation. Tout au contraire, la protéine dérivée de l'expression eucaryotique migre moins que la protéine procaryotique avant traitement enzymatique, après déglycosylation elle migre à la même hauteur que la protéine procaryotique.

Exemple II

Pour déterminer si BBG2Na issu d'*E. coli* (non-glycosylé) ou des cellules HEp-2 (glycosylé) sont similaires ou non du point de vue antigénique, les 2 formes de protéines ont été testées en ELISA contre un panel d'anticorps monoclonaux spécifiques de BBG2Na. Brièvement, les protéines ont été mises en contact avec ces anticorps à la même concentration sur des plaques ELISA et le titre en anticorps monoclonal a été déterminé en fonction de la dernière dilution de l'anticorps donnant une D.O. supérieure à 2 fois le bruit de fond de l'essai. Comme il peut être constaté dans la figure 2, les 2 formes de BBG2Na n'ont pu être distinguées entre elles, ce qui indique que les protéines sont très similaires d'un point de vue antigénicité.

Exemple III

Afin de comparer l'immunogénicité des 2 formes de BBG2Na, des souris BALB/c ont été immunisées 3 fois (à J0, J14 et J24) par voie intra péritonéale (ip) par 2 µg de BBG2Na non-glycosylé ou glycosylé, ou par l'antigène cellulaire HEP-2
5 contrôle, FI-VRS ou PBS. Deux semaines après la dernière immunisation, les sérums des souris ont été prélevés et ont été testés en ELISA contre des antigènes de VRS, comme décrit par Power, U.F. et al. (Virology, 230:155-166, 1997). Comme démontré dans la figure 3, les souris immunisées avec le peptide BBG2Na glycosylé ou non-glycosylé ont eu pratiquement le même titre en anticorps anti-VRS. Donc, les deux
10 formes de la protéine sont aussi très similaires du point de vue de leur immunogénicité.

Exemple IV

Afin de mettre en évidence la capacité protectrice des deux formes de BBG2Na les souris décrites ci-dessus dans l'exemple 3 ont été challengées par le VRS-A, 10 jours après la dernière immunisation. La figure 4 montre que toutes les 2 formes ont permis
15 d'obtenir une protection dans les poumons d'une manière stérilisante contre l'infection avec le VRS. Ces résultats indiquent que BBG2Na non-glycosylé et glycosylé sont autant protecteurs l'un que l'autre chez la souris.

Exemple V

Les résultats présentés en figures 2, 3 et 4 indiquent que le pouvoir vaccinal du peptide revendiqué n'est pas affecté du fait d'être non-glycosylé mais au contraire, il
20 reste aussi antigénique, immunogénique et efficace en terme de protection des poumons contre un challenge avec le VRS qu'un peptide glycosylé dérivé de la protéine G native ou exprimé dans des cellules eucaryotes.

Une étude d'immunopathologie a été réalisée chez la souris BALB/c (8 souris
25 par groupe), en comparant les peptides de fusion BBG2Na glycosylé (gBBG2Na), non-glycosylés (BBG2Na) et le FI-VRS.

Les souris sont immunisées à J0, J14, J24. Elles sont challengées avec 10^5 TCID₅₀ du RSV-A à J34 et sont sacrifiées, après ponction sanguine intracardiaque, 7 jours plus tard. Les poumons sont prélevés, réduits en petits fragments et traités par un
30 mélange enzymatique de collagénase, Dnase et Dispase comme décrit (H. Plotnicky-Gilquin et al., Virol., 258:128-40, 1999). Les cellules infiltrantes pulmonaires sont numérées puis marquées à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiques des différents

types de populations cellulaires. Les cytokines intracellulaires sont mises en évidence après stimulation des cellules et marquage intracellulaire par des anticorps spécifiques. L'analyse des cellules marquées est réalisée en utilisant le FACSvantage (Becton Dickinson).

5 I. Analyse des cellules pulmonaires

1. Au niveau de l'analyse des cellules pulmonaires, le nombre de cellules nucléées infiltrant les poumons après challenge est augmenté significativement dans les groupes de souris immunisées avec gBBG2Na et FI-VRS. De même, on constate un changement qualitatif des populations cellulaires présentes dans ces poumons, avec un
10 rapport CD4/CD8 significativement augmenté comme cela peut se voir sur la figure 5.

2. De même, le nombre de granulocytes (LGL) et de cellules marquées par l'anticorps RB6-8B5 (polynucléaires) est également considérablement augmenté dans les groupes immunisés avec gBBG2Na et FI-VRS (voir figure 6).

II. Sécrétion des cytokines Th2

15 En accord avec les changements quantitatifs et qualitatifs observés au niveau des cellules infiltrantes pulmonaires, on observe une augmentation significative de la sécrétion des cytokines Th2 (IL-5 et IL-10) chez les souris immunisées avec gBBG2Na et FI-VRS par rapport à celles traitées avec BBG2Na. Le profil de réponses avec BBG2Na est comparable à celui des souris traitées avec l'antigène cellulaire seul. La
20 sécrétion des cytokines Th2 (IL-5 et IL-10) est représentée à la figure 7.

L'augmentation des infiltrats cellulaires, l'augmentation du rapport CD4/CD8, l'apparition des polynucléaires et l'augmentation de la sécrétion de cytokines Th2 sont caractéristiques pour l'induction d'une immunopathologie induite par le VRS. Il a ainsi été démontré que la glycosylation de BBG2Na conduit à une potentialisation de son
25 profil immunopathologique, avec des effets comparables à ceux du FI-VRS.

REVENDEICATIONS

1/ Peptide immunogène dérivé de la protéine G du VRS, caractérisé en ce que ledit peptide est non-glycosylé et comporte au moins la séquence peptidique 148-193 de la protéine G du VRS humain du sous-groupe A ou B, ou du VRS bovin, ou une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences peptidiques 148-193 de ces protéines G.

2/ Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence peptidique 148-193 de la protéine G du VRS du sous-groupe A ou B comprend en position 173, 176, 182 et 186 une cystéine.

3/ Peptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit peptide immunogène dérivé de la protéine G du VRS a pour séquence une séquence choisie parmi les séquences 148-193, 148-200, 148-230, 140-193, 140-230, 130-193 et 130-200.

4/ Peptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit peptide immunogène dérivé de la protéine G du VRS a pour séquence une séquence choisie parmi les séquences :

- a) SEQ ID Nos. 1 à 3 ;
- b) SEQ ID Nos. 1 à 3 comprenant chacune d'entre elles les mutations C173S et C186S ;
- c) les séquences 140-200, 140-198, 140-196 et 140-194 des séquences telles que décrites en a) ou b) ;
- d) SEQ ID No. 1 comprenant les 6 mutations F163S, F165S, F168S, F170S, C173S et C186S ;
- e) SEQ ID No. 1 comprenant les 4 mutations N191S, K192N, G195K et T198P ;
- f) SEQ ID No. 1 comprenant les 4 mutations N157K, N160K, N161D et F163Y ; et
- g) SEQ ID No. 1 comprenant les 8 mutations N157K, N160K, N161D, F163Y, N191S, K192N, G195K et T198P ; ou
- h) les séquences 124-203 et 1-230 de la protéine G sauvage de VRS.

5/ Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, au moins un peptide selon l'une des revendications 1 à 4.

6/ Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle contient en outre au moins une protéine porteuse et/ou un adjuvant.

7/ Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique contient en outre un adjuvant, préférentiellement choisi
5 dans le groupe d'adjuvant comprenant le MPL-A, le Quil-A, l'ISCOM, le Diméthyl Dioctadécyl Ammonium sous forme de bromure (DDAB) ou de chlorure (DDAC), l'alum, l'adjuphos, les CpG, la Leif, la CT, la LT et les versions détoxifiées de la CT ou la LT.

8/ Composition selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que
10 ledit peptide est associé, par mélange ou par couplage, à la protéine porteuse et/ou à l'adjuvant.

9/ Composition selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique contient en outre un deuxième antigène, immunogène ou haptène du VRS et/ou un antigène, immunogène ou haptène dérivé de
15 micro-organisme responsable de pathologies des voies aériennes choisi parmi les para influenza virus (PIV 1, 2, 3, 4), l'influenza virus (A et B), les hantavirus, les streptocoques, les pneumocoques, haemophilus influenza type b, les rhinovirus, les coronavirus et les méningocoques.

10/ Composition selon l'une des revendications 5 à 9, caractérisée en ce que
20 ledit milieu pharmaceutiquement acceptable est constitué d'eau, d'une solution aqueuse saline ou d'une solution aqueuse à base de dextrose et/ou de glycérol.

11/ Composition selon l'une des revendications 5 à 10, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

25 12/ Anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un peptide selon l'une des revendications 1 à 4.

13/ Anticorps selon la revendication 12, caractérisés en qu'ils sont humanisés.

14/ Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend un peptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou un anticorps selon la revendication 12 ou 13.

30 15/ Utilisation d'un peptide immunogène dérivé de la protéine G du VRS non glycosylé et comportant au moins la séquence peptidique 185-193 de la protéine G du VRS humain, sous-groupe A ou B, ou bovin, ou comportant une séquence présentant au

moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences peptidiques 185-193 de ces protéines G, ou d'un anticorps selon la revendication 12 ou 13, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement prophylactique ou thérapeutique des affections provoquées par le VRS et n'induisant pas d'immunopathologies.

- 5 16/ Utilisation d'un peptide immunogène dérivé de la protéine G du VRS non glycosylé et comportant au moins la séquence peptidique 185-193 de la protéine G du VRS humain, sous-groupe A ou B, ou bovin, ou comportant une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec lesdites séquences peptidiques 185-193 de ces protéines G, ou d'un anticorps selon la revendication 12 ou 13, pour la préparation d'une
10 composition pharmaceutique destinée au traitement prophylactique ou thérapeutique des affections provoquées par le VRS, sous-groupe A ou B et n'induisant pas d'immunopathologies.

- 17/ Utilisation selon l'une des revendications 15 ou 16, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène dérivé de la protéine G du VRS non glycosylé est un peptide
15 selon l'une des revendications 1 à 4.

1/4

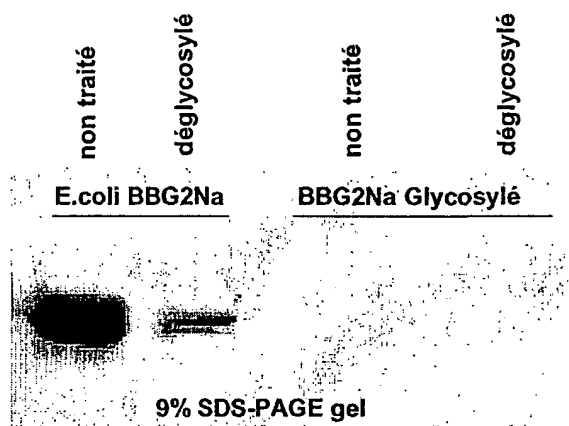


FIGURE 1

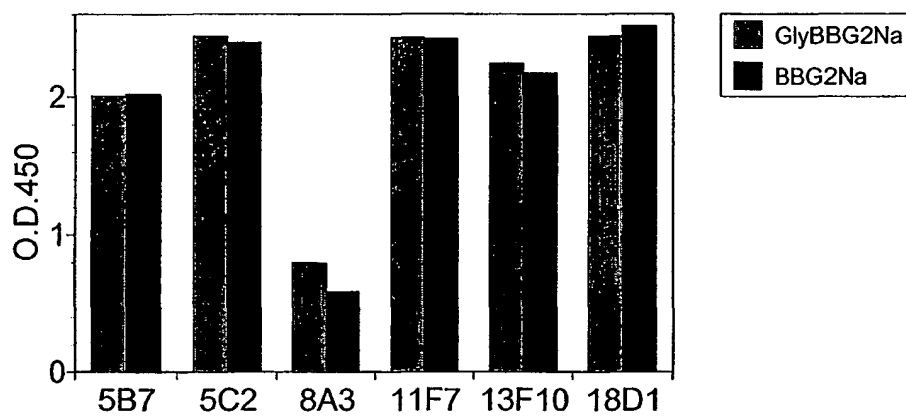


FIGURE 2

2/4

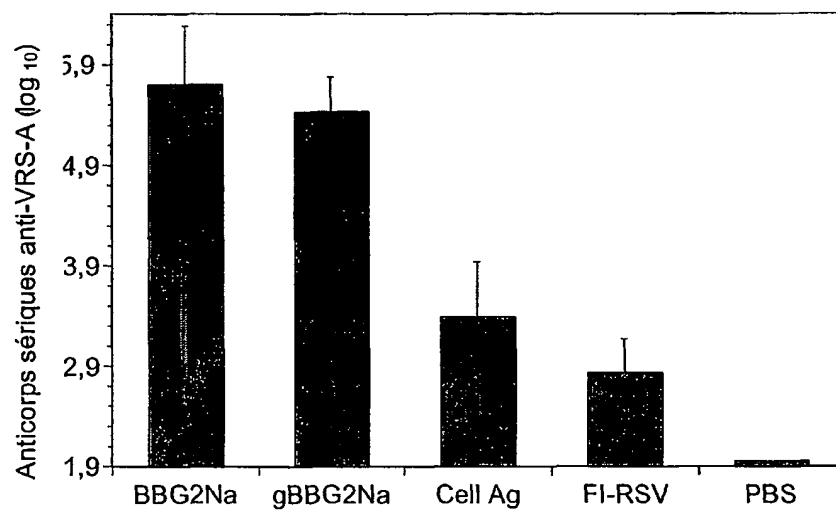


FIGURE 3

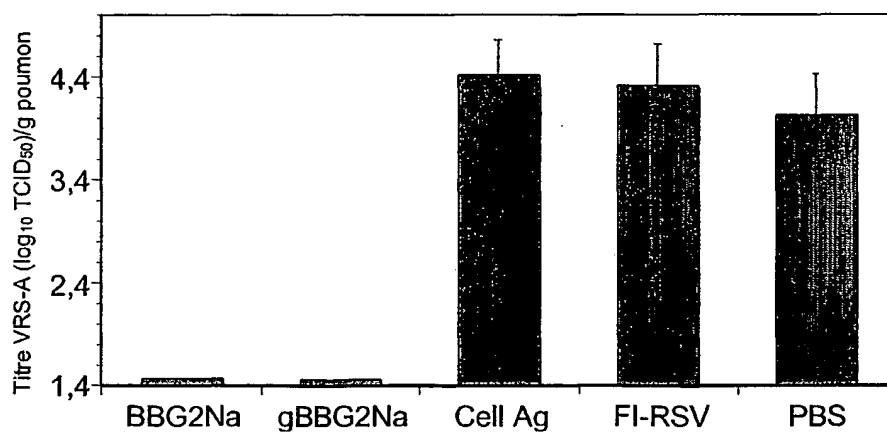


FIGURE 4

3/4

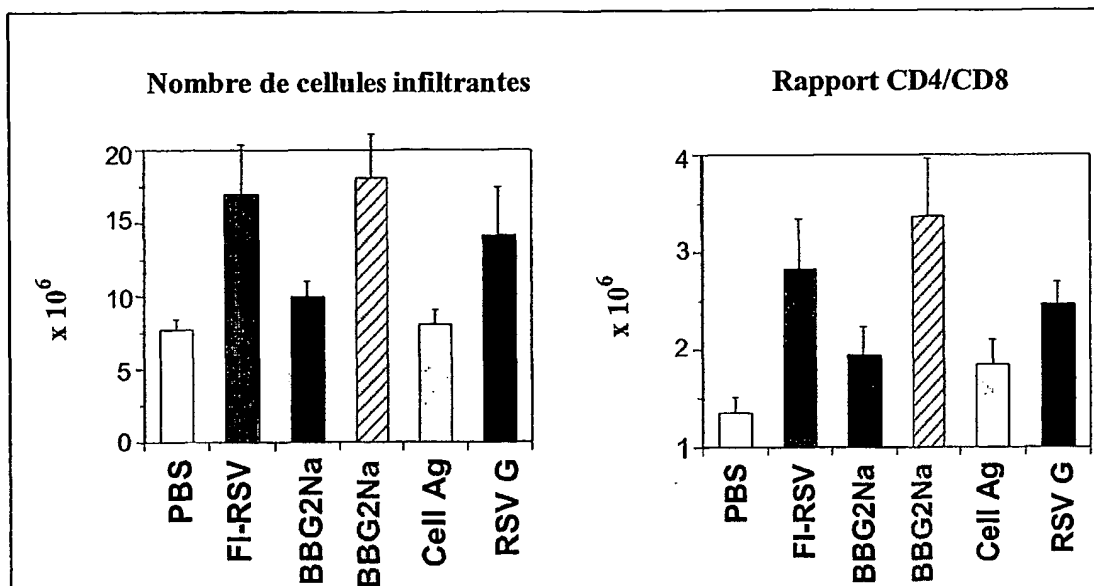


FIGURE 5

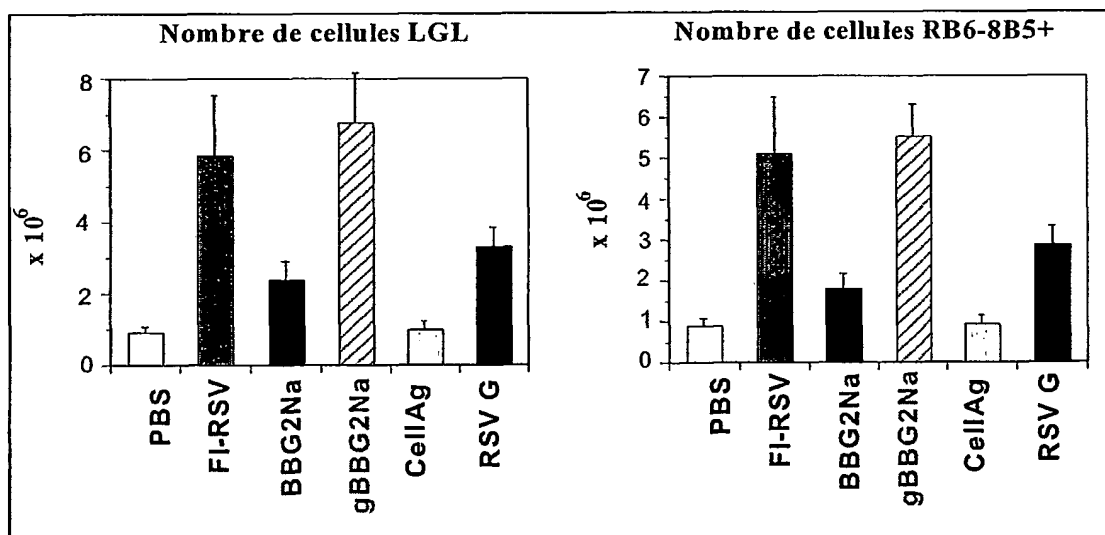


FIGURE 6

4/4

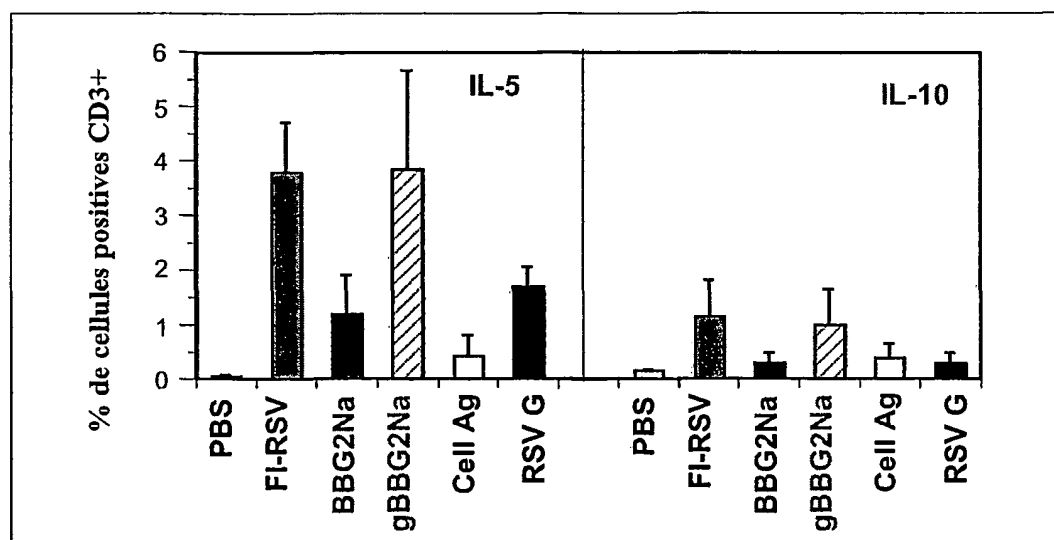


FIGURE 7

1

LISTE DE SEQUENCES

<110> Pierre Fabre Médicament

<120> PEPTIDES NON GLYCOSYLES DERIVES DE LA PROTEINE G DU VRS
ET LEUR UTILISATION DANS UN VACCIN

<130> D 19303

<150> FR 01 00 875

<151> 2001-01-23

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> Virus Respiratoire Syncytial humain de type A

<220>

<223> G2A, fragment aa 130-230 de la proteine G

<400> 1

Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys
1 5 10 15

Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn
20 25 30

Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
35 40 45

Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
50 55 60

Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys
65 70 75 80

Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val
85 90 95

Pro Thr Thr Lys Pro
100

<210> 2

<211> 101

<212> PRT

<213> Virus Respiratoire Syncytial humain de type B

<220>

<223> G2B, fragment aa 130-230 de la proteine G

<400> 2

Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln Thr Asn Lys
1 5 10 15

Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro Lys Asp

2

20 25 30
 Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly
 35 40 45
 Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys
 50 55 60
 Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr Thr Lys
 65 70 75 80
 Thr Thr Asn Lys Arg Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Met Pro Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ile Ile Thr Asn
 100

<210> 3
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Virus Respiratoire Syncytial bovin

<220>
 <223> G2V, fragment aa 130-230 de la proteine G

<400> 3
 Gln Asn Arg Lys Ile Lys Gly Gln Ser Thr Leu Pro Ala Thr Arg Lys
 1 5 10 15
 Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His Gln Asp
 20 25 30
 His Asn Asn Phe Gln Thr Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu
 35 40 45
 Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Cys His Ile Glu Thr Glu Arg Ala
 50 55 60
 Pro Ser Arg Ala Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys Thr Pro Lys Pro Lys
 65 70 75 80
 Thr Thr Lys Lys Pro Thr Lys Thr Thr Ile His His Arg Thr Ser Pro
 85 90 95
 Glu Thr Lys Leu Gln
 100

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Respiratoire Syncytial humain de type A

<220>
 <223> fragment aa 185-193 de la proteine G

<400> 4
 Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
 1 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.